匍枝根霉纤维二糖合成酶胞内糖基供体的初探及结构功能研究*

张莹莹[1]　汤斌[1,2]**　堵国成[1]

（1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122）

（2 安徽工程大学生物与化学工程学院 芜湖 241000）

摘要　纤维二糖可有效诱导丝状真菌产纤维素酶，前期研究表明匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* TP-02 具有纤维二糖合成酶（CBS），可以尿苷二磷酸葡萄糖（UDPG）为糖基供体合成纤维二糖，从而开启纤维素酶的自诱导合成途径。为研究 *R. stolonifer* 中纤维二糖的胞内合成途径，通过重叠 PCR 在 GDP-葡糖焦磷酸化酶基因 *ggp* 中引入硫胺吡啶抗性基因 *ptr*A，分别转化原菌 TP-02 和*Δugp* 突变株，构建*Δggp* 和*Δugp*/*Δggp* 突变株。利用液质联用（LC-MS）检测突变株的胞内糖组分，发现 *ggp* 的缺失对胞内纤维二糖合成的影响较弱，而同时缺失 *ugp* 则将直接导致二糖合成受阻。RT-qPCR 结果显示*Δggp* 突变株中纤维素酶基因转录水平较原株 TP-02 下调 20%左右，而*Δugp*/*Δggp* 突变株中被测基因的转录水平则出现了高达 80%左右的下调。同时对突变株纤维素酶表达水平进行研究，发现*Δugp*/*Δggp* 突变株中几乎检测不到纤维素酶活力。结果显示，UDPG 为 *R. stolonifer* 胞内合成纤维二糖的主要糖基供体，而 GDPG 可能是 UDPG 的替代物，在 UDPG 不足时维持胞内二糖合成。此外，利用生物信息学方法对 CBS 结构功能深入分析，经丙氨酸扫描确定其合成纤维二糖的关键作用残基为 Asp210 和 Asp300，为后续进一步研究及理性改造提供方向和理论依据。

关键词　纤维二糖　纤维素酶　匍枝根霉　合成机制

中图分类号　Q78

纤维素酶是一种由内切葡聚糖酶（EG）、外切葡聚糖酶（CBH）和β-葡萄糖苷酶（BG）组成的复合酶，通过三者的协同作用催化纤维素及其衍生物中的β-1,4-糖苷键的水解，因而在木质纤维素转化为糖的过程中具有重要的意义[1,2]。传统纤维素碳源能诱导丝状真菌分泌纤维素酶全酶系，但存在底物利用率低，产酶速度慢，发酵周期长等多种问题，制约大规模工业生产。目前，槐糖、纤维二糖、乳糖和淀粉糖等已被相继报道具有诱导纤维素酶表达的作用[3-5]。其中，纤维二糖是丝状真菌产纤维素酶的天然诱导因子，可有效诱导里氏木霉、黑曲霉和粗糙脉孢菌等解纤维素真菌中纤维素酶基因的表达[6-8]。前期研究发现，匍枝根霉纤维素酶合成过程中存在一个关键酶，即纤维二糖合成酶 CBS[9]。它能以葡萄糖的次级代谢产物尿苷二磷酸葡萄糖（UDPG）为底物，在胞内合成纤维二糖。这一结果揭示了匍枝根霉可在糖类碳源培养条件下利用自身合成的纤维二糖开启纤

*　国家自然科学基金资助项目（31270135）

**　通讯作者，电子信箱：tangbin@ahpu.edu.cn

维素酶的诱导合成。然而，对于纤维二糖在胞内的合成机制尚不明确。

糖类的合成离不开糖基供体，目前已发现了 3 种核苷二磷酸葡萄糖（ADPG、UDPG 和 GDPG）。在植物细胞中用于合成蔗糖的主要糖基供体是 UDPG；合成淀粉的是 UDPG 和 ADPG[10]；合成纤维素的是 GDPG 和 UDPG[11]。其中，UDPG 是植物和细菌中β-1,4-葡聚糖生物合成的首选底物，它是微生物体内合成糖苷、寡糖和多糖的常规糖基供体，由葡萄糖通过 Leloir 途径合成而来，涉及葡萄糖激酶（GLK）、葡萄糖磷酸变位酶（PGM）和 UDP-葡糖焦磷酸化酶（UGP）的催化作用[12,13]。此外，据报道哺乳动物中鸟苷二磷酸甘露糖焦磷酸化酶（GMP）可催化葡萄糖-1-磷酸形成鸟苷二磷酸葡萄糖 GDPG[14]。同时，在真菌中也发现了 GDPG 的存在。

为了探究 CBS 在胞内合成纤维二糖的机制，本文通过缺陷株构建及转录水平分析，确定 CBS 胞内合成纤维二糖的糖基供体及其代谢通路，并结合生物信息学手段分析 CBS 与底物间的分子互作，通过丙氨酸扫描确定关键作用残基，实现对 CBS 结构功能的初步研究，为后续理性改造提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

匍枝根霉 TP-02（*R. stolonifer* TP-02），大肠杆菌 DH5α和 *R. stolonifer Δugp* 突变株（含潮霉素抗性）均保藏于安徽工程大学可再生资源研究实验室。其中，*Δugp* 为 UDP-葡糖焦磷酸化酶编码基因 *ugp* 缺失菌株，由本实验室前期构建[9]。潮霉素 B、吡啶硫胺素和 UDPG 均购自 Sigma；RT-qPCR 相关试剂均购自 TAKARA；分子生物学相关试剂及 Marker 均购自上海生工；基因测序由上海生工完成。

1.2 基因克隆及分析

将 *R. stolonifer* TP-02 接入 PDA 液体培养基中，30°C，200 rpm 振荡培养 24 h 后，离心收集菌丝体进行冷冻干燥。通过 CTAB 法[15]提取基因组 DNA 作为模板，利用引物对 ggp-F（5’-ATGGATAAAAGTGAAGAAATTCTTG-3’）+ ggp-R（5’-TTATAGGTTAGCATTATGCGTTTC-3’）进行扩增。反应条件为：95°C 预变性 5 min；94°C 变性 30 s，55°C 退火 45 s，72°C 延伸 50 s，共 30 个循环；72°C

终延伸 10 min。利用试剂盒纯化 PCR 产物，送上海生工测序。利用 BLAST 搜索引擎在 GenBank 数据库中进行比对分析。

利用 Discovery Studio 3.0 软件通过同源建模构建 CBS 的立体结构，利用 MVD 软件进一步对 CBS 活性区域进行计算，并以 CHARMm 计算模式完成 CBS 与底物 UDPG 的分子对接，分析氢键作用力，确定作用位点。

1.3 突变株的构建

利用重叠 PCR 技术[16]将硫胺吡啶抗性基因 *ptr*A 插入到 *ggp* 中，引物列于表 1 中。将构建的融合基因 *ptr*A-*ggp* 与 pUCm-T 载体连接并转化到大肠杆菌 DH5α 中，筛选阳性克隆进行鉴定并送样测序。将 pUCmT-*ptr*A-*ggp* 分别加入到预处理的 *R. stolonifer* TP-02 和*Δugp* 突变株的孢子悬浮液中（萌发 8 h），并置于冰上 10 min 后转入电极杯，1500 V 电击后将溶液立即加入到 1 mL 预先冷却的 PDA 液体培养基中冰浴 20 min，30°C，100 rpm 培养 90 min 后将其涂布到抗性平板（吡啶硫胺素 0.15 μg/mL）上，并在 30°C 下培养直至菌落形成。萌发孢子的制备：用无菌水冲洗孢子，经两层纱布过滤，接种到 PDA 液体培养基中，在 30°C，180 rpm 培养 8 h，直到孢子萌发（电子显微镜用于观察确定孢子萌发时间）。

表 1 重叠 PCR 引物序列

Table 1 The sequences of primers for overlapping PCR

Primers	Sequences (5’-3’)
ggp-F	5’-ATGGATAAAAGTGAAGAAATTCTTG-3’
ggpPtrA-F1	5’-GAAAGCCCCTACTGGCTCATATGCATGTCTCCTCCAGCTGCCATCTAC-3’
ggpPtrA-F2	5’-GTAGATGGCAGCTGGAGGAGACATGCATATGAGCCAGTAGGGGCTTTC-3’
ggpPtrA-R1	5’-CGTCAGCGCGAGTGTGCTGAGTAATTTAGAAATAGCATGTTTGATGAG-3’
ggpPtrA-R2	5’-CTCATCAAACATGCTATTTCTAAATTACTCAGCACACTCGCGCTGACG-3’
ggp-R	5’-TTATAGGTTAGCATTATGCGTTTC-3’

此外，利用重叠 PCR 在 *cbs* 中引入突变，进行 D210、S298、D300、E336 和 W340 位点的丙氨酸扫描，转化原菌 TP-02 构建突变株，具体引物如表 2 所示。

表 2 定点突变引物序列

Table 2 The sequences of primers for site-directed mutagenesis

Primers	Sequences (5’-3’)[1)]
D210A-F	5’-GCCATCTTCGCCGCAGACTCC-3’
D210A-R	5’-GGAGTCTGCGGCGAAGATGGC-3’
S298A-F	5’-CAGCTTCGCCGAGGATTGGC-3’

S298A-R	5’-GCCAATCCTCGGCGAAGCTG-3’
D300A-F	5’-CTTCTCCGAGGCCTGGCAGC-3’
D300A-R	5’-GCTGCCAGGCCTCGGAGAAG-3’
E336A-F	5’-CACATTGCAGCCCGCAACCG-3’
E336A-R	5’-CGGTTGCGGGCTGCAATGTG-3’
W340A-F	5’-GCAACCGGGCCCACATTGGC-3’
W340A-R	5’-GCCAATGTGGGCCCGGTTGC-3’

1) 下划线为引入突变位点

1.4 RT-qPCR

取冷冻干燥后的菌丝体100 mg，快速研磨后利用RNAiso Plus试剂抽提总RNA，并利用试剂盒去除基因组DNA后进行单链cDNA的合成。利用SYBR荧光染料进行RT-qPCR。根据前期实验获得的关键纤维素酶基因（GenBank登录号分别为JX315341、KP115896、KF916015和KF916016）设计引物，具体见表3。利用LightCycler 96分析实验数据，以甘油醛3-磷酸脱氢酶编码基因*gpd*A为内参基因，根据$2^{-\Delta\Delta CT}$法[17]计算所测基因的mRNA水平。

表3 RT-qPCR各引物序列

Table 3 The sequences of primers for RT-qPCR.

Gene	Primers	Sequences (5’-3’)
*gpd*A	GPDA-F	5’-TACCGCTGCCCAGAACATC-3’
	GPDA-R	5’-GGAGTGGCTGTCACCGTTC-3’
eg	EG2-F	5’-TTATTGGGTTTGTTGTCAGGC-3’
	EG2-R	5’-GTGCTTTGAATTGATTGCTCC-3’
bg	BG3-F	5’-CGAGGACATTGCCTTGCTGA-3’
	BG3-R	5’-GTTTGTGGAGGGAATAGTGGG-3’
cbh1	CBH1-F	5’-CTTATTGTGGAGGCGGTTGC-3’
	CBH1-R	5’-CAGGTGGTATCGGTGGAGC-3’
cbh2	CBH2-F	5’-CCTGGCTATCCCATCCCTC-3’
	CBH2-R	5’-CGTTCTGGGCTTTGATGTCG-3’

1.5 体外实验

将纯化得到的蛋白CBS（100 μg）与0.5 mM ATP和UDPG（20 mg）的混合物溶于1 mL PBS缓冲液（pH 6.0，50 mM）中，并将混合物在30°C下搅拌1天[9]。将反应后的混合物离心并用0.45 μm过滤膜处理。采用HPLC分析样品的组成。

1.6 检测方法

1.6.1 色谱测定

分别收集发酵液上清及菌体，将上清经0.22 μm膜过滤后直接进样；菌体则经生理盐水冲洗后超声破碎，浓缩20倍添加无菌水复溶后过膜处理。HPLC测定条件：色谱柱：XBridge Amide；柱温：30°C；流动相：82%乙腈-18%水；流速：0.4 mL/min；进样体积：20 μL。标样配置：流动相配置1%混标。LCMS测定条件：LCMS-8030液相色谱质谱仪；LC条件同上；电喷雾电离（ESI）；DL 250°C；雾化气体3 L/min；热熔400°C；干燥气体15 L/min。

1.6.2 酶活测定

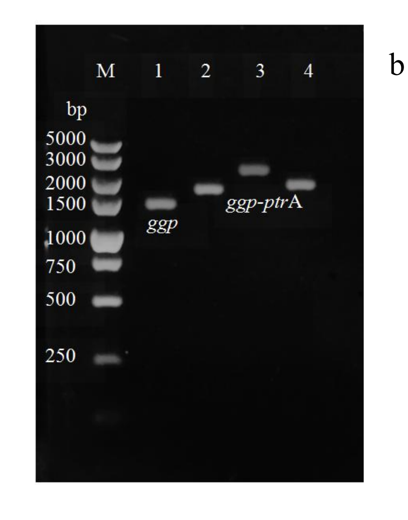
采用DNS法[18]测定酶活。酶活定义为：每分钟水解产生1 μmol还原糖所需的酶量为一个IU单位。FPA酶活测定：将发酵液样品适当稀释后取1 mL加入含1 cm ×6 cm滤纸的比色管中，用0.1 mM醋酸钠缓冲溶液（pH4.8）定容到2 mL，50°C水浴振荡反应30 min后加入3mL DNS试剂，煮沸结束反应，冷却后稀释到25 mL，测定OD_{540}。

2 结果

2.1 突变株*Δggp*和*Δugp*/*Δggp*的构建

为明确 *R. stolonifer* TP-02 胞内合成纤维二糖的糖基供体，利用重叠 PCR 构建 *ggp-ptr*A 融合基因（图 1a），并分别转化原株 TP-02 和突变株*Δugp*。PCR 验证结果显示*Δggp* 和*Δugp/Δggp* 突变株构建成功（图 1b）。

a



b

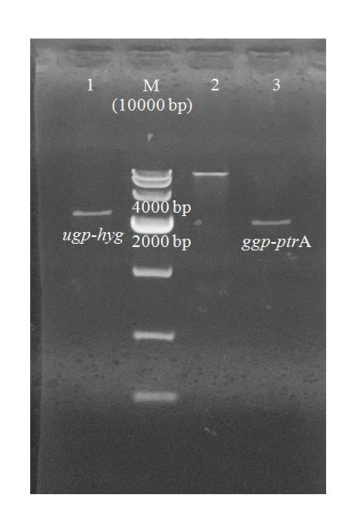


图1突变株*Δggp*和*Δugp*/*Δggp*的构建

Fig.1 Construction of *Δggp* and *Δugp*/*Δggp* mutants

(a) Construction of fusion gene *ggp-ptr*A by overlapping PCR. M:5000bp DNA Marker; 1: *ggp*; 2: *ggp*A+*ptr*A; 3: *ggp-ptr*A; 4: *ggp*B+*ptr*A. (b) PCR identification of the mutants. M:10000 bp DNA Marker; 1: *ugp-hyg*B; 2: Genome DNA of *Δugp*/*Δggp*; 3: *ggp-ptr*A.

2.2 突变株胞内糖组分分析

通过HPLC分析比较原株TP-02及其突变株在以葡萄糖为唯一碳源时的胞内糖组分，结果显示*Δggp*样本中含纤维二糖特征峰，出峰时间与原菌接近，将该特征峰收集后进行LCMS鉴定确为纤维二糖。同时，*Δugp*和*Δugp*/*Δggp*突变株样本中则未检测到纤维二糖峰，即突变体可能无法合成纤维二糖或其合成产物浓度低于检测线（图2）。这意味着*ggp*的缺失对二糖合成影响较弱，而*ugp*的缺失则将直接导致二糖合成受阻，故而UDPG很可能是纤维二糖合成酶CBS合成纤维二糖的主要糖基供体。

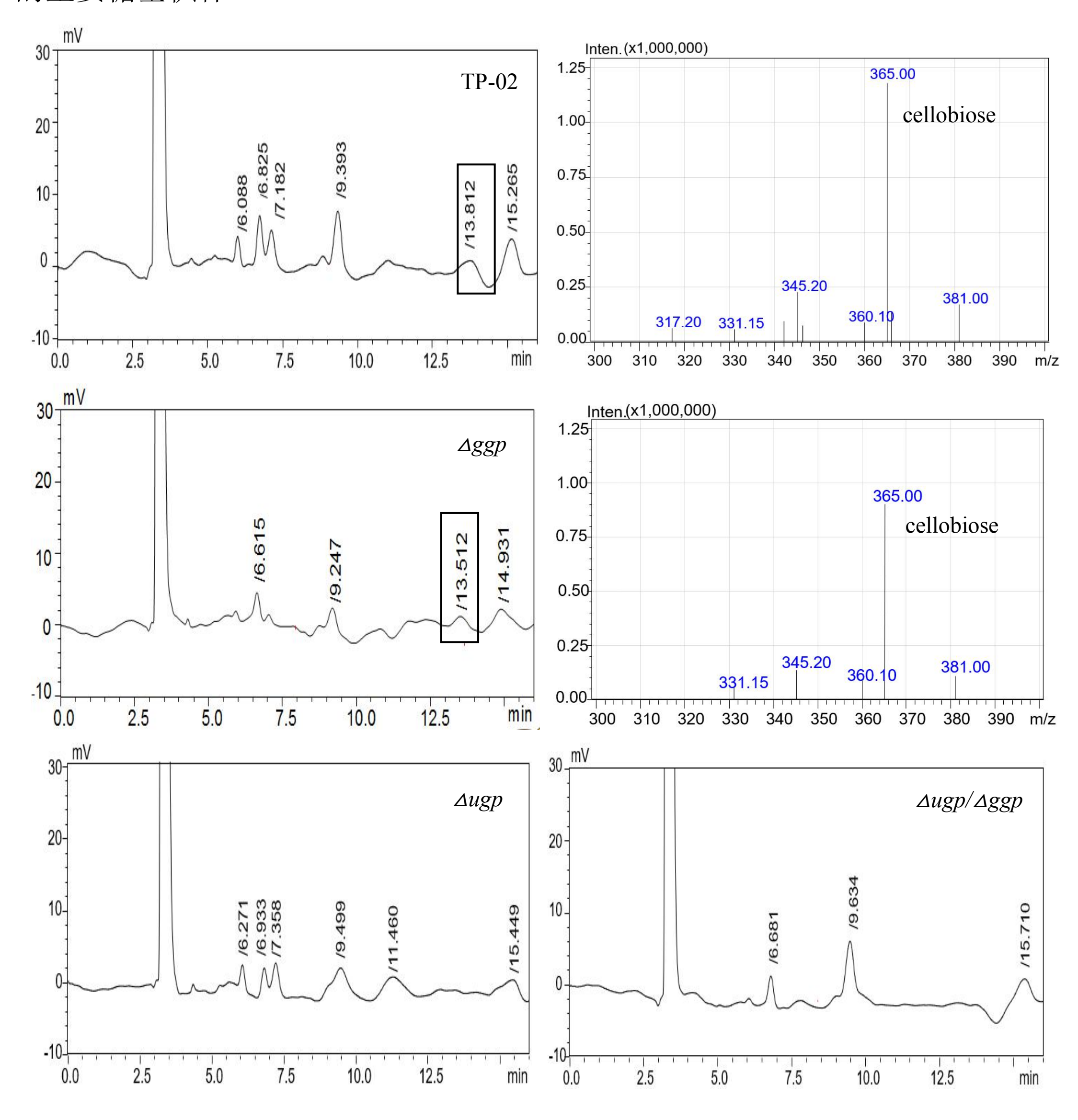


图2 色谱检测胞内糖组分

Fig.2 Chromatographic detection of intracellular sugars

2.3 突变株产纤维素酶特性研究

分别提取原菌及其突变株的总RNA进行逆转录，利用RT-qPCR对纤维二糖合成酶基因*cbs*和纤维素酶基因转录水平进行研究。结果显示，单一缺失*ggp*对被测基因造成的影响不大（平均下调20%左右）。然而，当同时缺失*ugp*后，所有被测基因的转录都出现了显著下调（>80%）。此外，在前期研究中已报道*Δugp*突变株中各纤维素酶基因的转录水平平均下调75%左右。进一步对以上菌株的纤维素酶表达水平进行研究，在葡萄糖为唯一碳源下进行同水平发酵，酶活测定结果显示，*Δugp*和*Δugp*/*Δggp*突变株样本中几乎检测不到FPA活力，而*Δggp*的FPA活力较原菌下降37%。综合以上结果，*ggp*的缺失虽无显著影响，但其存在的意义很可能是当胞内UDPG不足时，为CBS提供替代底物GDPG。

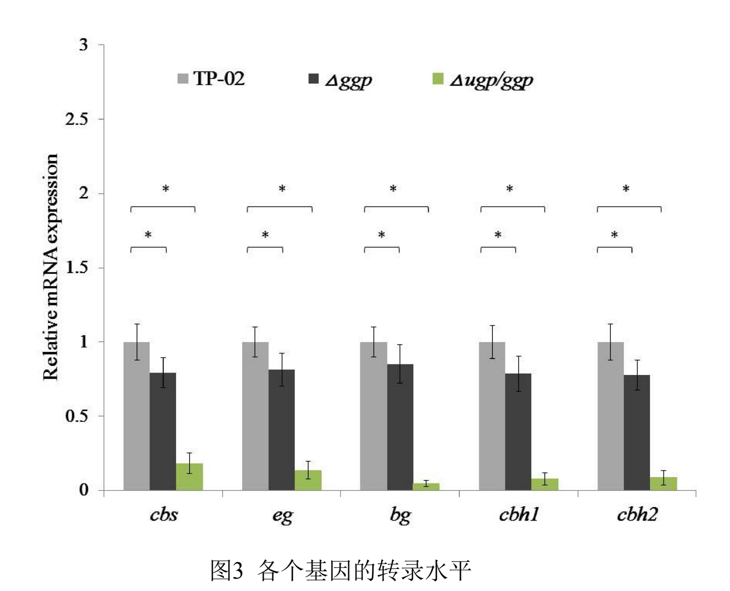


图3 各个基因的转录水平

Fig.3 The transcription level of different genes

The data are presented as mean ± s.e.m. from three independent experiments. The statistical significance was calculated with the t-test, *P < 0.05.

2.4 纤维二糖合成酶结构功能初探

为了研究CBS合成纤维二糖的作用机制，利用Discovery Studio 3.0软件，以同源建模法构建CBS的三维结构。利用MVD软件进一步对CBS活性区域进行计算，并以CHARMm计算模式完成CBS与底物UDPG的分子对接（图4a）。结果显示，在CBS的活性中心入口处Pro118，Cys120，Asp150，Ala185，Ser298和Glu299

参与UDPG的结合（图4b，UDPG分子以黄色标示）。经模拟，UDPG与CBS的结合构象较多，参与其结合过程的氨基酸多为Asp，Ser和Glu（图4c,d）。经氢键作用力比较分析，推测Asp210，Ser298，Asp300，Glu336和Trp340可能为CBS作用于UDPG的主要残基。

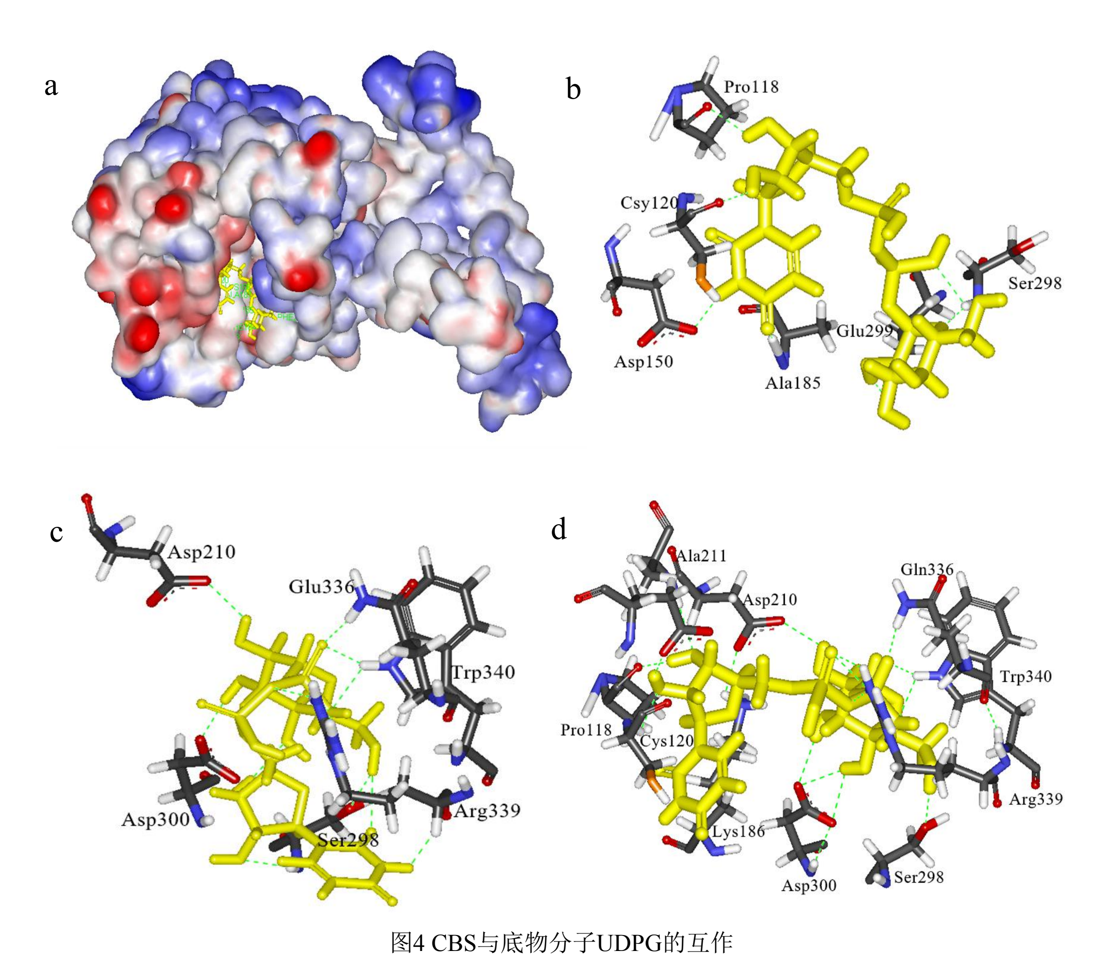


图4 CBS与底物分子UDPG的互作

Fig.4 Interaction between CBS and its substrate molecular UDPG

利用丙氨酸扫描确定CBS的关键作用残基，通过重叠PCR技术实现突变株的构建。将构建的突变子分别连接pET28a并在大肠杆菌BL21（DE3）中成功表达。通过镍株纯化获得CBS的5个重组蛋白D210A、S298A、D300A、E336A和W340A。对纯化所得蛋白分别进行体外实验，并通过HPLC进行产物分析。结果显示，W340A和S298A的纤维二糖合成能力与初始CBS的能力相仿，而E336A合成的二糖含量明显低于源蛋白（图5）。最为显著的是D210A和D300A，这两个重组蛋白的纤维二糖合成能力几乎丧失，其体外实验产物中未检测到显著的二糖峰。这意味着Asp210和Asp300这两个位点的天冬氨酸对CBS合成纤维二糖能力的表征起着决定性作用，是CBS的关键催化残基。

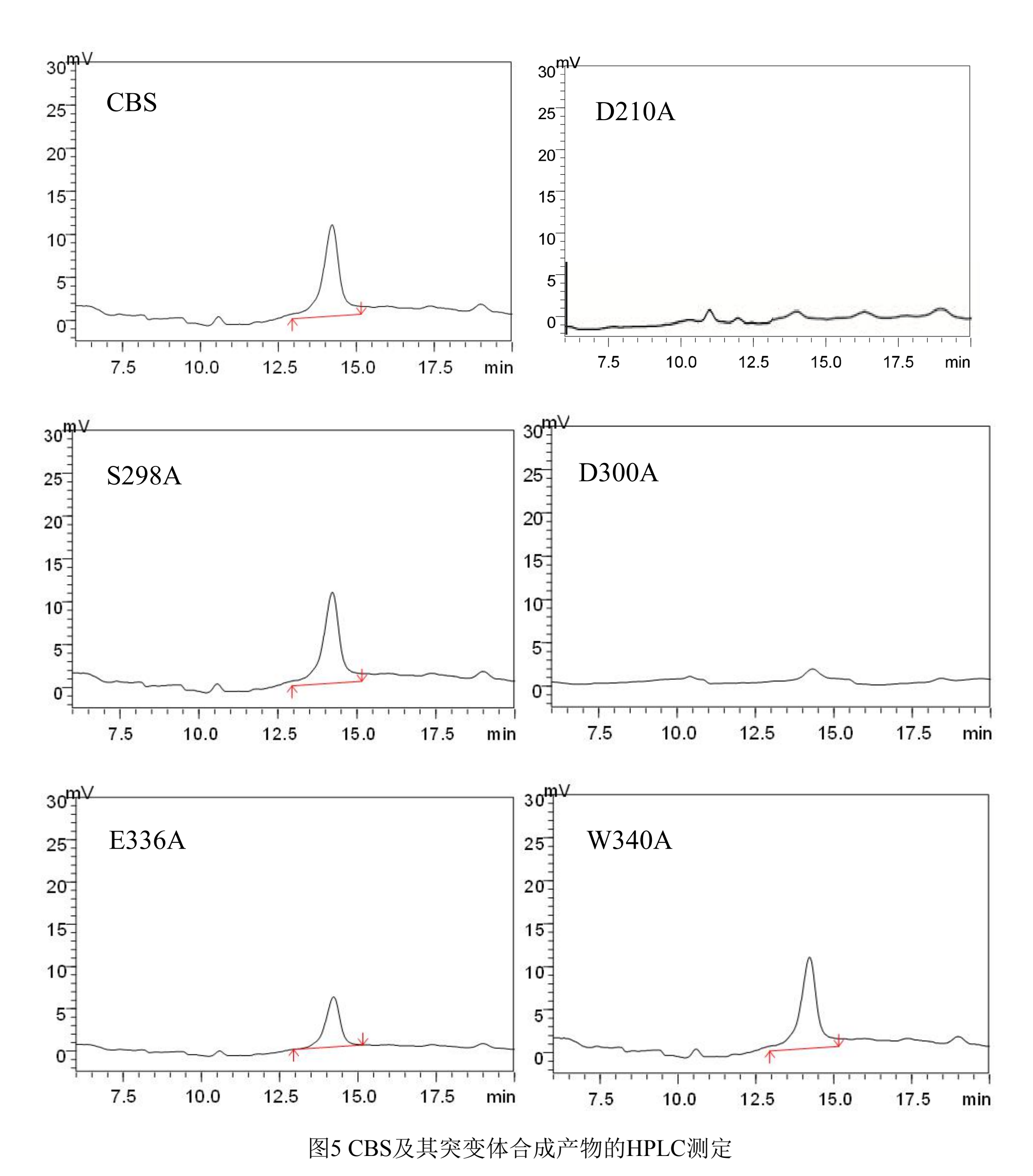


图5 CBS及其突变体合成产物的HPLC测定

Fig.5 HPLC profiles of the product synthesized by CBS and its mutants

2.4 讨论

随着CBS合成纤维二糖过程中糖基供体的确定，纤维二糖体内合成途径逐渐清晰。如图6所示，不同的底物在生物利用过程中释放出葡萄糖进入胞内，经己糖激酶作用形成葡萄糖-6-磷酸，部分进入糖酵解途径形成丙酮酸，最终进入三羧酸循环；而另一部分则在磷酸变位酶的作用下形成葡萄糖-1-磷酸，在核苷二磷酸焦磷酸化酶的作用下形成纤维二糖的糖基供体UDPG和/或GDPG，最终在纤维二糖合成酶CBS的作用下合成胞内纤维二糖，开启纤维素酶基因的诱导表达。至于纤维二糖是如何诱导纤维素酶的，有待于后续研究。

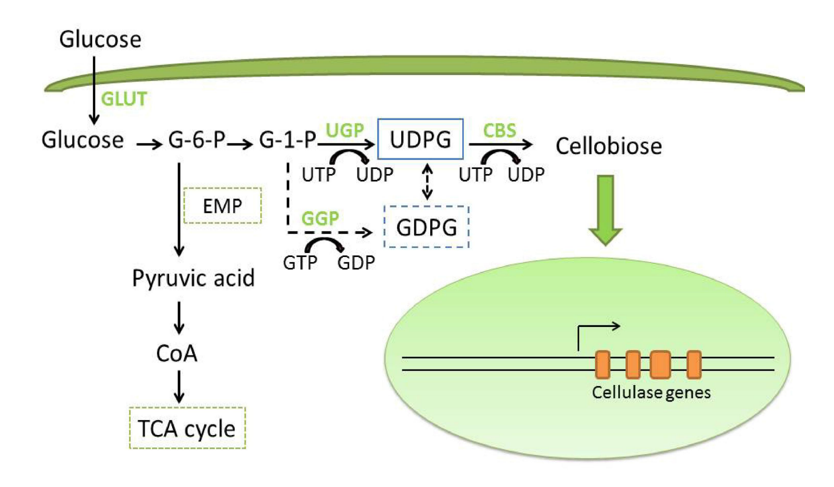


图6 纤维二糖胞内合成途径示意图

Fig.6 Schematic diagram of the intracellular synthesis pathway of cellobiose

胞内纤维二糖合成途径的解析，为揭示匍枝根霉纤维素酶诱导机制提供了新的思路。即只要有葡萄糖存在，匍枝根霉均能够通过自身的一系列代谢合成纤维素酶基因转录的诱导因子纤维二糖，这一自合成体系更新了纤维素酶合成领域的研究，也为组成型纤维素酶的形成提供了理论依据。

参考文献

[1] Payne C M, Knott B C, Mayes H B, et al. Fungal cellulases. Chem Rev, 2015, 115(3): 1308-1448.

[2] Lehmann L, Rønnest N P, Jørgensen C I, et al. Linking hydrolysis performance to *Trichoderma reesei* cellulolytic enzyme profile. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(5): 1001-1010.

[3] Mandels M, Parrish F W, Reese E T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride.* J Bacteriol, 1962, 83: 400-408.

[4] Zhou Q, Xu J, Kou Y, et al. Differential involvement of β-glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. Eukaryot Cell, 2012, 11(11): 1371-1381.

[5] Bischof R, Fourtis L, Limbeck A, et al. Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. Biotechnol Biofuels, 2013, 6(1): 127.

[6] Jourdier E, Cohen C, Poughon L, et al. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. Biotechnol Biofuels, 2013, 6(1): 79.

[7] Hanif A, Yasmeen A, Rajoka M I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger* Bioresource Technol, 2004, 94(3): 311-319.

[8] Znameroski E A, Li X, Tsai J C, et al. Evidence for transceptor function of cellodextrin transporters in *Neurospora crassa.* J Biol Chem, 2014, 289(5): 2610-2619.

[9] Zhang Y, Tang B, Du G. Self-induction system for cellulase production by cellobiose produced from glucose in *Rhizopus stolonifer.* Sci Rep, 2017, 7(1): P10161.

[10] Baxter E D, Duffus C M. Starch synthetase: Comparison of UDPG and ADPG as glucosyl donors in immature barley endosperm Planta, 1973, 114(2): 195-198.

[11] Kumar M, Turner S. Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms Phytochemistry,

2015, 112: 91-99.
[12] Coradetti S T, Xiong Y, Glass N L. Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa*. MicrobiologyOpen, 2013, 2(4): 595-609.
[13] Leloir L F, Cardini C E. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. J Am Chem Soc, 1957, 79: 6340-6341.
[14] Adle L N, Gomez T A, Clark S G, et al. A novel GDP-D-glucose phosphorylase involved in quality control of the nucleoside diphosphate sugar pool in *Caenorhabditis elegans* and Mammals. J Biol Chem, 2011, 286(24): 21511-21523.
[15] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, et al. IUPAC Collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans & maize in dried powder. J Aoac Int, 1999, 82(4): 923-928.
[16] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain resction. Gene 1989, 77(1): 51-59.
[17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method. Methods 2001, 25(4): 402-408.
[18] Miller G L, Blum R, Glennon W E, et al. Measurement of carboxymethylcellulase activity. Anal Biochem, 1960, 1(2): 127-132.

Study On The Intracellular Glycosyl Donor And Structural Function Of Cellobiose Synthase From *Rhizopus Stolonifer*

ZHANG Ying-ying[1] TANG Bin[1,2] DU Guo-cheng[1]
(1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)
(2 College of Biochemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract Cellobiose can effectively induce the production of cellulase by filamentous fungi. Our previous studies showed that *Rhizopus stolonifer* TP-02 has a cellobiose synthase (CBS) that can synthesize cellobiose by utilizing uridine diphosphate glucose (UDPG) as the glycosyl donor, thereby opening the self-induced synthesis pathway of cellulase from glucose. To study the intracellular biosynthesis pathway of cellobiose, the pyrithiamine resistance gene *ptr*A was inserted into the GDP-glucose pyrophosphorylase gene *ggp* by overlapping PCR. The fused gene *ggp*-*ptr*A was respectively transformed into TP-02 and *Δugp* for constructing the *Δggp* and *Δugp*/*Δggp* mutants. LC-MS was used to analyze the intracellular sugar components of mutants. The results showed that the lack of *ggp* has a weak effect on the synthesis of intracellular cellobiose, while the lack of *ugp* directly inhibits the synthesis of disaccharides. The result of RT-qPCR showed that the transcription level of cellulase genes in *Δggp* mutant are 20% lower than that of the original strain, while the tested gene in *Δugp*/*Δggp* are down-regulated by 80%. Furthermore, the expression levels of cellulase were also studied. However, the FPA activity of *Δugp*/*Δggp* was not detected. These results showed that UDPG is the major glycosyl donor for intracellular synthesis of cellobiose in *R. stolonifer*, whereas GDPG may be the substitute for UDPG, maintaining the synthesis of disaccharides in the absence of UDPG. In addition,

bioinformatics methods were used to analyze the structure and function of CBS. Through alanine scanning the Asp210 and Asp300 were confirmed as the key residues of CBS to synthesize the cellobiose, providing a direction and theoretical basis for further research and rational transformation.

Key Words cellobiose cellulase *Rhizopus stolonifer* synthesis mechanism